Loopamp®

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) method

Campylobacter Detection Kit

Loopamp®
カンピロバクター検出試薬キット

LAMP法を用いたカンピロバクター検出検査の準備と手順

栄研化学株式会社

2006年4月　第一版

目次

はじめに
《LAMP法検査の実施にあたり》

CONTENTS

I.　検査の概要

❑製品の概要

- ◆ 近年、カンピロバクター食中毒は増加しており、平成12年以降は、病因物質別食中毒発生件数において1位または2位となっています。カンピロバクター属の中で食中毒と関係が深いのは、食品衛生法施行規則にも記載されている *Campylobacter jejuni*（以下、*C. jejuni*）と*Campylobacter coli*（以下、*C. coli*）であり、食中毒患者から検出される殆どが*C. jejuni*と*C. coli*で、その大部分が*C. jejuni*です。培養法による食品中のカンピロバクター検査では、増菌から分離、同定までに5日程度の日数を必要とします。
- ◆ 本キットは、添付の抽出試薬で簡便に遺伝子を抽出し、LAMP法※により、*C. jejuni*の酸化酵素関連遺伝子（Oxidoreductase gene）、*C. coli*のアミノ酸合成酵素関連遺伝子（Aspartate kinase gene）を増幅・検出することで、増菌培養の翌日に、わずか2時間以内で*C. jejuni*、*C. coli*の有無を判定できます。
- ◆ 核酸増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム（白色沈殿物質）による濁度の増加を測定することによって行います。濁度測定には専用の「Loopamp®リアルタイム濁度測定装置」を用います。

※ LAMPとはLoop-mediated Isothermal Amplificationの略であり、栄研化学が独自に開発した、迅速、簡易、精確な遺伝子増幅法です。

❑製品の特徴

◆ 食品中のカンピロバクターをわずか2日で検出することができます。

▧ 試料の増菌培養(24時間)後、抽出操作を含めて、わずか2時間以内に検出することができます。

◆ カンピロバクターの遺伝子を特異的かつ迅速に検出します。

▧ *Campylobacter jejuni*、*Campylobacter coli*遺伝子の保存性の高い領域に対して設計した、特異性の高いプライマーを使用しています。また、増幅効率の高いLAMP法なので反応は1時間で終了します。

◆ リアルタイム濁度測定装置で増幅から検出を1つのチューブで完了します。

▧ 専用の「Loopamp®リアルタイム濁度測定装置」を用いて、増幅から検出までを1ステップで行うことができます。また、電気泳動での検出を必要としないため1つのチューブで完了します。

❑カンピロバクター検査フローチャート（図1）

◆ 増菌培養

▧ 例）食品25gをプレストン培地100mLに加え、42℃、24時間微好気条件下で増菌培養を行います。

❖ 増菌培養は、施設で行っている方法に基づいてください。

◆ 遺伝子の抽出

▧ 増菌培養液に、Extraction Solution for Foods（EX F）を添加します。

▧ 95℃、5分間加熱抽出します。

▧ 抽出後、1M Tris-HClを添加します。

◆ LAMP反応・検出

▧ 上記抽出液をサンプル溶液とし、Loopamp®カンピロバクター検出試薬キットを使用して遺伝子の増幅、検出を行います。

▧ LAMP反応および濁度測定は専用の「Loopamp®リアルタイム濁度測定装置」を用います。

▧ LAMP反応は65℃、1時間で行います。

▧ LAMP反応終了後、80℃、2分間にて酵素を失活します。

増菌培養

例）食品25g　＋　増菌培地100mL
（プレストン培地、CEM培地など）
42℃、24時間微好気培養

培養液　50μL

遺伝子の抽出

- EX F 50μL添加
- 95℃、5分間加熱
- 1M Tris-HCl 10μL添加
- 2,000×g、60秒間

↓

上清⇒**抽出遺伝子溶液**

マスターミックス調製（LAMP反応試薬）

（1サンプルあたり）

2×Reaction Mix.	12.5μL
Primer Mix. Cam	2.5μL
Distilled Water	4μL
Bst DNA Polymerase	1μL
Total	20μL

・反応チューブにマスターミックスを20μLずつ分注

LAMP反応・検出

- 試薬・遺伝子混合（マスターミックス20μLにサンプル遺伝子、コントロールを各 5μL 添加）
- リアルタイム濁度測定装置にセット
- 反応開始（65℃、1時間）
- 濁度測定・判定（リアルタイム濁度測定装置）
- 酵素失活(80℃、2分間)

図1. LAMP検査の流れ

II.　検査に必要な試薬

❑ 増菌培地

◆ プレストン培地、CEM培地など

❑ LAMP試薬

【Loopamp®カンピロバクター検出試薬キット】（図2）

◆ キット内容

Loopamp®カンピロバクター検出試薬キット	48テスト分	
(1) Extraction Solution for Foods（EX F)*	1.8mL	× 2tubes
(2) 1M Tris-HCl：pH7.0（Tris)*	1.0mL	× 1tube
(3) 2×Reaction Mix.（RM)*	0.6mL	× 1tube
(4) Primer Mix. Cam（PM Cam)*	0.12mL	× 1tube
(5) Distilled Water（DW)*	1.0mL	× 1tube
(6) *Bst* DNA Polymerase（Bst DNA Polymerase）*	60 μL	× 1tube
(7) Positive Control Cam（PC Cam ）*	0.1mL	× 1tube

＊；（ ）内は試薬チューブに記載されている表示です。

◆ 操作別使用試薬一覧（図3）

- 抽出操作
  - (1) Extraction Solution for Foods
  - (2) 1M Tris-HCl：pH7.0
  - ◇ 領域Bにて使用、保存します。
- マスターミックス調製
  - (3) 2×Reaction Mix.
  - (4) Primer Mix. Cam
  - (5) Distilled Water
  - (6) *Bst* DNA Polymerase
  - ◇ 領域Aにて使用、保存します。
- 抽出遺伝子とマスターミックスの混合
  - 【陰性コントロール】
  - (5) Distilled Water
  - ◇ 領域A にて必要量を予め分注し、領域Cにて使用、保存します。
  - 【陽性コントロール】
  - ◇ (7) Positive Control Cam
  - ◇ 領域Cにて使用、保存します。

◆ 保存温度

- -20℃に保存
  - ◇ 保存温度は厳守してください。

◆ 有効期間

- 製造後1年間
  - ◇ キット外箱に使用期限の表示があります。表示の期限内にご使用ください。

◆ 注意事項

- 試薬が余った場合は同一ロットであっても他キットへの使用はしないでください。

図2.　Loopamp® カンピロバクター検出試薬キット

領域A
マスターミックス調製
•2×Reaction Mix.
•Primer Mix. Cam
•Distilled Water
•*Bst* DNA Polymerase
領域Aにて使用、保存します。

領域B
増菌培養
•増菌培地
領域Bにて使用、保存します。
抽出操作
•Extraction Solution for Foods
領域Bにて使用、保存します。
•1M Tris-HCl：pH7.0
領域Bにて使用、保存します。

領域C
抽出遺伝子とマスターミックスの混合
•マスターミックス（領域Aにて調製）
•陰性コントロール
Distilled Water
必要量を予め分注し、領域Cにて使用、保存します。
•陽性コントロール
Positive Control Cam
領域Cにて使用、保存します。

領域D
（使用試薬なし）

図3. 作業領域と使用試薬の関連イメージ

III. 検査に必要な器具・機器類

❑ 使用器具・機器類一覧

◆ 使用する器具・機器類は処理検体数等により変わりますのでご注意ください。

名称	図	使用領域				備考
		増菌培養	抽出	試薬調製	LAMP試薬混合	
器具類						
フィルター付きストマッカー用バッグ	4-②	○				増菌培養用バッグ ※必ずフィルター付きのストマックバッグを使用してください。
滅菌メスピペット（ディスポーザブル）	4-④	○				液状の検体(食品)の計量及び増菌培養液の採取に使用します。
微好気培養パックとジャー	4-⑦	○				ふ卵器で微好気培養する際に使用します。
可変マイクロピペット(1～10μL)	5-①			●	○※1	※1：どちらか1種類で可。また、5μL計量できるピペットであれば可変でなくても可。サンプル用、陽性コントロール用を別にしてください。
可変マイクロピペット(2～20μL)	5-①		○	○	○※1	
可変マイクロピペット(20～200μL)	5-①		○	○		
可変マイクロピペット(200～1000μL)	5-①		○	●※2		※2：大量検体（10反応以上）でのマスターミックス調製に使用します。 抽出：遠心上清の採取に使用します。
疎水性フィルター付チップ	5-②		○	○	○	使用するマイクロピペットに合わせて準備します。
滅菌マイクロチューブ（1.5mL）	5-③		○	○		試薬調製：マスターミックス調製に使用します。 サンプルからのDNA抽出に使用します。
Loopamp®反応チューブ	5-④			○		マスターミックス分注、LAMP反応に使用します。 保管は試薬調製領域で行ってください。
アルミ製チューブラック(試薬用)	5-⑤			○		チューブと氷等が接触するなど、チューブの冷却が可能なラックであれば代用が可能です。
アルミ製チューブラック（Loopamp®反応チューブ用）	5-⑤			○	○	同上
チューブラック（マイクロチューブ用）	5-⑥		○	○	○	
アイスボックス	5-⑦		○	○	○	発泡スチロールの箱で代用可能。
機器類						
はかり	4-①	○				固形の検体（食品）の計量に使用します。
ストマッカー	4-③	○				検体（食品）と増菌培地を均一化します。
安全ピペッター	4-⑤	○				液状の検体(食品)の計量及び増菌培養液の採取に使用します。
ふ卵器または微好気培養ふ卵器	4-⑥	○				微好気条件で1晩培養します。
ボルテックスミキサー	5-⑧		○	○		
微量簡易遠心機（1.5mLチューブ用）	5-⑨		○	○		数秒間の遠心(スピンダウン) 及び検体の遠心処理に使用します。
微量簡易遠心機（0.2mL 8連チューブ用）	5-⑨				○	8連チューブのスピンダウンに使用します。
ヒートブロック	5-⑩		○			検体処理に使用します。
クリーンベンチ	5-⑪			○	○※3	試薬調製、マスターミックスの分注を行います。
生物学的安全キャビネット	5-⑫	○	○		○※3	感染性検体の取り扱いを行います。クラスIIa以上。
クラッシュアイス製氷機	5-⑬		○	○	○	検体及び試薬冷却用の氷を作製します。
リアルタイム濁度測定装置	11,12	（LAMP反応・検出、結果判定）				LAMP増幅反応および判定に使用します。

●・・・必須ではありません。　○※3・・・参照 「資料 I．クリーンベンチと安全キャビネットについて」（P.21）

III.　検査に必要な器具・機器類

❑ 増菌培養に必要な器具・機器（図4）

① はかり
- 検体（食品）計量用

② フィルター付きストマッカー用バッグ
- 増菌培養用バッグ
- ❖ 必ずフィルター付きのストマッカー用バッグを使用してください。

③ ストマッカー
- 検体(食品)と増菌培地を均一化します。

④ 滅菌メスピペット（ディスポーザブル）
- 10～25mLを計量できるものを使用します。

⑤ 安全ピペッター
- 液状検体(食品)の計量及び増菌培養液の採取に使用します。

⑥ ふ卵器
- 卓上型ふ卵器AP（栄研器材）

⑦ 微好気培養パックとジャー
- アネロパック®・微好気(三菱ガス化学)

⑧ 生物学的安全キャビネット（図5 ⑬）
- 感染性のある検体の操作を行います。
- クラスIIA以上機能対応装置（*C.jejuni*および*C.coli*の取り扱いはバイオセーフティーレベル2（BSL2）となっています）
- ❖ 参照「資料 Ⅲ.引用文献 10)」（P.28）
- クリーンベンチで検体は取り扱わないでください。
- ❖ 参照 「資料 I. クリーンベンチと安全キャビネットについて」 （P.21）

図4. 増菌培養に必要な器具、設備

❑ 抽出に必要な器具・機器（図5）

① 可変マイクロピペット
- 1～1,000μLを可変で採取できるもの。
  - ◇ 2～20μL
  - ◇ 20～200μL
  - ◇ 200～1,000μL　など

② 滅菌済疎水性フィルター付チップ
- ～20μL/～200μL/～1000μLなどピペットにあった組み合わせ。

③ 滅菌マイクロチューブ（1.5mL）
- 増菌培養液の採取と抽出操作に用います。

⑥ チューブラック
- 0.5～1.5mL用

⑦ アイスボックス
- 遺伝子抽出したサンプル溶液を氷冷します。
- 発泡スチロールの箱で代用可能。

⑧ ボルテックスミキサー
- 検体と試薬を混ぜる際に使用します。

⑨ 微量簡易遠心機
- 1.5mLチューブ用

⑩ ヒートブロック
- 加熱抽出処理に使用します。

図5. LAMP法に必要な器具

III.　検査に必要な器具・機器類

❑ 遺伝子抽出に必要な器具・機器（図5）～続き

⑫ 生物学的安全キャビネット

- 感染性のある検体の操作を行います。
- クラスIIA以上機能対応装置（ *C.jejuni*、*C.coli*の取り扱いはバイオセーフティーレベル2（BSL2）となっています）
- ❖ 参照 「資料 I.クリーンベンチと安全キャビネットについて」 （P.21）
- ❖ 参照「資料 Ⅲ.引用文献 10)」（P.28）

⑬ クラッシュアイス製氷機

- 検体及び試薬冷却用の氷を作製します。

❑ 試薬調製・分注に必要な器具・機器類（図5）

① 可変マイクロピペット

- 1～1,000μLを可変で採取できるもの
  - ◇ 1～10μL（必須ではありません）
  - ◇ 2～20μL
  - ◇ 20～200μL
  - ◇ 200～1,000μL（大量検体（10反応以上）でのマスターミックス調製に使用）

  の4種類など
- 用途別に用意します。
  - ◇ 試薬調製用（上記4種類）

② 滅菌済疎水性フィルター付チップ

- ～20μL/～200μL/～1000μLなどピペットにあった組み合わせ。

③ 滅菌マイクロチューブ（1.5mL）

- マスターミックス調製用。

④ Loopamp®反応チューブ

- LAMP法専用。8本連結チューブ。12本セット入。
- 必ず専用チューブをご使用ください 。

⑤ アルミ製チューブラック

- 検体や試薬の氷上操作時にアイスボックス内で使用します。

⑥ チューブラック

- 0.5～1.5mL用。

⑦ アイスボックス

- 試薬およびマスターミックスの冷却に使用します。
- 発泡スチロールの箱で代用可能。

⑧ ボルテックスミキサー

- 試薬の調製や検体と試薬を混ぜる際に使用します（マスターミックスの場合、酵素失活の可能性があるので、混和時間は数秒にとどめる） 。

⑨ 微量簡易遠心機

- マイクロチューブ用：試薬調製時のスピンダウンに使用します。

⑪ クリーンベンチ

- 試薬の調製およびマスターミックスの分注時に使用します。
- 試薬調製には専用の器具として前頁の「使用器具・機器類一覧」の器具を別途ご用意ください。
- ❖ 参照 「資料 I.クリーンベンチと安全キャビネットについて」 （P.21）

⑬ クラッシュアイス製氷機

- 検体及び試薬冷却用の氷を作製します。

❑ LAMP試薬混合に必要な器具

① 可変マイクロピペット

- 5μL計量できるもの（可変でなくても可）。
- 各専用のピペットを用意します。
  - ◇ サンプル（および陰性コントロール）用
  - ◇ 陽性コントロール用

② 滅菌済疎水性フィルター付チップ

- ①のピペットに使用可能なもの。

⑤ アルミ製チューブラック

- 検体や試薬の氷上操作時にアイスボックス内で使用します。
- 抽出操作用ラックの兼用可。

⑦ アイスボックス

- マスターミックス分注済8連チューブの冷却に使用します。
- 発泡スチロールの箱で代用可能。

⑨ 微量簡易遠心機

- 8連チューブ用：反応チューブのスピンダウンに使用します。

⑪クリーンベンチ

⑫生物学的安全キャビネット

- 抽出遺伝子と試薬を混合します。
- ❖ 参照 「資料 I.クリーンベンチと安全キャビネットについて」 （P.21）

⑬ クラッシュアイス製氷機

- 検体及び試薬冷却用の氷を作製します。

IV.　検査を行う上での注意事項

❖ LAMP反応は大量のDNA産物を生成する遺伝子増幅検査であり、使用する試薬等は微量ですので、検体、遺伝子、試薬の取り扱いを誤ると検査結果に大きく影響します。検査実施の際には以下の注意事項をよくご理解いただき検査を実施してください。

遺伝子増幅検査をおこなう上では、主に
「バイオハザード」
（検体処理時）
「DNase、RNaseのコンタミネーション」
「遺伝子のコンタミネーション」
（遺伝子抽出操作、試薬調製、反応液と抽出遺伝子の混合操作時）
の3点に対する注意が重要になります。

❖ 取り扱いの詳細に関しては「資料 Ⅱ.遺伝子増幅検査を行う上での注意事項（詳細版）」（P.22）をご参照ください。

図6. LAMP法操作における領域分けのイメージ

❑ 作業領域

操作内容により作業領域を指定し、操作を制限します（図6、7）。

◆ 試薬調製領域（領域A）

- 作業内容－－マスターミックス調製、分注。
- クリーンベンチ内で操作をおこないます。

◆ 感染性検体等取り扱い領域（領域B）

- 作業内容－－増菌培養、抽出操作。
- 生物学的安全キャビネットや、無菌的操作を実施できる作業台などで操作をおこないます。

◆ 遺伝子添加領域（領域C）

- 作業内容－－マスターミックスと抽出遺伝子の混合操作
- マスターミックスと抽出遺伝子の混合操作は、吹出しタイプでないクリーンベンチ(バイオクリーンベンチ)または生物学的安全キャビネットなどで操作をおこないます。

◆ 遺伝子増幅領域（領域D）

- 作業内容－－遺伝子増幅反応
- 試薬調製領域、感染性検体等取り扱い領域、抽出作業・遺伝子添加領域とは別の区切られた領域とします。
- この領域に増幅に必要な機器等を設置します。

❖ 領域Bと領域Cは、各領域の隔離が可能であれば、同室内で設定頂いても問題ありません。

❖ 領域Bの生物学的安全キャビネット内で、領域Cの作業を行う場合は、「資料 Ⅱ.遺伝子増幅検査を行う上での注意事項(詳細版)」(P.22)をご理解の上で実施して下さい。

図7. 領域区分の一例

❑ 使用器具・試薬等

原則各領域専用とし、物品の領域外への移動は必要最小限にします。

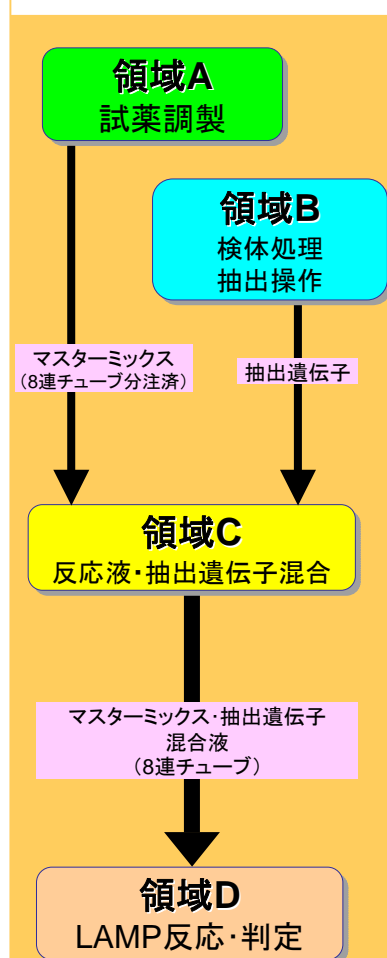
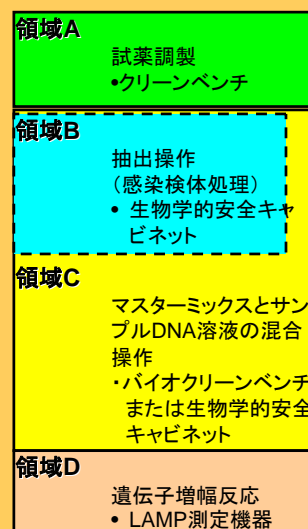
◆ マイクロピペット（図8）

- 各領域専用で使用し、他領域への兼用・移動は厳禁とします。

◆ チップ

- 疎水性フィルターチップを使用し、その都度使い捨てとします。
- 開封後は他領域への移動は厳禁とします。
- 使用済みチップは使用後は密閉し、速やかに廃棄してください。

◆ チューブ

- 市販滅菌済チューブ、オートクレーブ処理済チューブ等を使用します。
- 開封後は他領域への移動は厳禁とします。
- 使用済みチューブは、使用後は密閉し速やかに廃棄してください。
- Loopamp®反応チューブにはUV照射しないでください。材質の変色により誤判定をもたらすことがあります。

IV.　検査を行う上での注意事項

◆ **チューブラック**
- ピペット同様、各領域専用で使用します。
- 移動したラックを元の領域へ戻すには、次亜塩素酸・UV処理後に戻します。

◆ **筆記用具**
- 各領域専用のものとし、筆記用具を媒介した汚染を防止します。

◆ **機器等（遠心機・ヒートブロックなど）**
- 各領域専用で使用し、他領域との兼用・移動は厳禁とします。

◆ **試薬（表1）**
- 各領域専用で使用・保管し、他領域との兼用・移動は厳禁とします。

◆ **その他**
- 物品は各領域専用とします。

❏ 作業者

◆ **手袋**
- サイズの合った使い捨て手袋（ラテックス手袋など）を着用します。

◆ **マスク・ゴーグル**
- マスクは使い捨てのものを、ゴーグルは各領域専用のものを使用します。

◆ **白衣・作業衣**
- きれいな白衣を使用します。定期的にクリーニングを施し、長期洗浄していない白衣の使用は避けます。

◆ **作業者の移動**
- 極力遺伝子高濃度領域から低濃度領域への移動は避けるよう心がけます。

❏ 操作

◆ **操作全般**
- 操作前後に、使用する作業台やピペット等を次亜塩素酸ナトリウム水溶液を染み込ませたキムタオル等で拭き取ってください。
- 操作中に抽出遺伝子等をこぼした場合には、速やかに次亜塩素酸ナトリウム水溶液を染み込ませたキムタオル等で拭き取り、廃棄してください。
- 検査室内での私語、飲食、喫煙は控えてください。

◆ **ピペット操作**
- 吸引操作はゆっくり行い、空気の吸い込みを避けます。
- 液の排出のときは、チップ先をチューブ壁面に付け、壁面を伝わせ排出します。
- 微量な液の操作は、確実に吸引排出されていることを確認してください。
- 検体、抽出遺伝子の分注にはチップをその都度交換してください。

◆ **チューブの取り扱い**
- チューブ蓋の開閉には蓋裏の突起に触れないように注意してください。

◆ **試薬の取り扱い**
- 解凍した試薬（酵素以外）は、ボルテックス（またはタッピング）・スピンダウンし、濃度を均一にしてから使用ください。酵素はボルテックスせず、スピンダウン後に使用してください。
- 使用中の試薬は、使用まで氷中、または低温の状態で保存してください。
- 酵素など粘性の高い試薬の採取には、チップ先は液の奥まで入れないでください。
- 試薬の保管の際は、各試薬の保存条件を遵守してください。

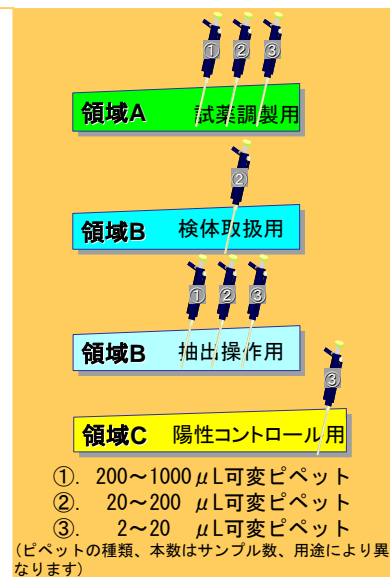



図8. ピペット領域分けの例

表1. 試薬の領域分けの例

Extraction Solution for Foods	領域Bにて使用、保存します。
1M Tris-HCl: pH7.0	領域Bにて使用、保存します。
2×Reaction Mix.	領域Aにて使用、保存します。
Primer Mix. Cam	領域Aにて使用、保存します。
Distillesd Water	領域Aにて使用、保存します。また、一部を陰性コントロール用として分注し、領域Cにて使用、保存します
Bst DNA Polymerase	領域Aにて使用、保存します。
Positive Control Cam	領域Cにて使用、保存します。

IV.　検査を行う上での注意事項

❏ 検査前後の遺伝子除去操作

◆ 次亜塩素酸ナトリウム水溶液等による遺伝子不活化

- 0.55％(v/v)次亜塩素酸ナトリウム水溶液等を用意します。
- 作業前後には作業台、ピペットを次亜塩素酸ナトリウム溶液を含めたキムタオル等でふき取ります。
- サンプル、増幅産物溶液をこぼした場合には次亜塩素酸ナトリウム溶液等を含めたキムタオル等で速やかにふき取ります。
- 作業終了後にはラック（プラスチック製など非金属製のもの）等を次亜塩素酸ナトリウム水溶液等に1晩浸し、よくすすいだ後乾燥し、再利用します。
- 検査室、作業台、器具等は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液等にて洗浄します。
- 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用の際には、換気を十分にしてください。
- ❖ 市販のDNA・RNA除去剤も同様に使用します。

◆ 紫外線照射による遺伝子不活化

- 作業終了後にはラック（金属製など非プラスチック製のもの）をUVに1晩照射し再利用します。
- UVは影の部分には効果がないので、照射の際には注意します。
- 使用後の検査室のUV管点灯による照射も効果的です。
- ❖ 市販のDNA・RNA除去剤も同様に使用します。

❏ DNA・RNAのコンタミネーション発生時

◆ 対処法の一例

- ディスポーザブルのピペットチップ、試薬調製用チューブ等は廃棄します。
- 作業机、クリーンベンチ、安全キャビネット内を次亜塩素酸ナトリウム水溶液や、市販のDNA、RNA除去剤で拭きます。
- ピペット、チューブスタンド等の器具は、次亜塩素酸ナトリウム水溶液や、市販のDNA、RNA除去剤で拭きます。プラスチック製など次亜塩素酸ナトリウムによる腐食の影響がない材質性の器具に関しては次亜塩素酸ナトリウム水溶液に一晩浸します。
- 次亜塩素酸ナトリウム水溶液や、市販のDNA、RNA除去剤で洗浄済み器具類をクリーンベンチ、安全キャビネット内に置き、UV照射して一晩放置します。
- 後日陰性コントロールを測定し、除染の確認をおこないます。
- その他、施設の安全規程に従います。
- 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用の際には、換気を十分にしてください。

❏ ルール化

◆ 作業ルールの作成

- 操作をルール化することにより、操作する人による注意点の誤差を少なくしてください。そのことによりコンタミネーションのリスクを軽減でき、さらにコンタミネーション発生時の原因究明に役立ちます。

V.　廃棄方法について

❑ 廃棄方法について

原則的には、各施設の廃棄基準に則り処理を行ってください。
併せて、遺伝子のコンタミネーションについても注意をしてください。

◆ 検体の廃棄方法について

- 感染性のあるものは不活化処理をおこなったうえで廃棄してください。
- 検体は必要に応じ感染性廃棄物の取り扱いに準じ廃棄してください。

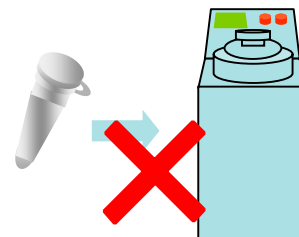
◆ 抽出廃液の廃棄方法について

- 廃棄の際には必要に応じて中和処理をおこなってください。
- その他の廃液は次亜塩素酸ナトリウム水溶液での処理などの非感染性化処理を施したうえで、産業廃棄物として廃棄してください。

◆ チップ、チューブの廃棄について

- 使用済みのチップ、チューブは次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて1晩浸し、非感染化・DNAフリーにした状態で廃棄してください。

◆ 増幅産物の廃棄について

- 増幅産物の入ったチューブは決して開けないでください。高濃度の遺伝子が飛散し周辺が汚染する可能性があります。
- 増幅産物の入ったチューブのオートクレーブ処理は決しておこなわないでください。遺伝子が蒸気によりエアロゾル化し、室内が汚染する可能性があります。
- 廃棄の際にはチューブごとビニール袋などに入れ、口を縛り密封した状態で施設の廃棄基準に従って廃棄してください。

操作手順

CONTENTS

I. 増菌培養 Ⅱ．サンプルからの遺伝子抽出

❑ 増菌培養 （図9）【領域B】

【領域B にて操作します】

(増菌培養の例)

① 検体の食品を25g採取します。試料が固体の場合は滅菌したハサミ、ナイフ等で小片に刻みます。

② フィルター付きストマッカー用バッグに採取した食品および、増菌用培地としてプレストン培地100mLを入れ、ストマッカー処理を行い均一化します。

③ ストマッカー処理した増菌培養液10mLを試験管に採り、微好気条件下で42℃、24時間増菌培養します。

❖ レバー類の食品検査の場合は、その成分によってLAMP反応が影響を受けますのでご使用になれません。

❑ サンプルからの遺伝子抽出

【領域B にて操作します】

④ 増菌培養液50μLをそれぞれ別に用意した滅菌チューブ（1.5mL）に採取します。

⑤ Extraction Solution for Foods (EX F) 50μLを添加します。

⑥ ボルテックスミキサーで攪拌後、微量簡易遠心機でスピンダウンします。

⑦ 95℃、5分間の加熱処理を行います。

❖ この操作により感染性がなくなります。

⑧ 加熱処理したチューブを一度スピンダウンした後、1M Tris-HCl：pH7.0（Tris）10μLを添加します。

⑨ キャップを閉め、ボルテックスミキサーで混合し、微量簡易遠心機で室温にて2,000×g、60秒間遠心します。

⑩ 氷上に移し、上清をサンプル溶液とします。

❖ サンプル溶液は原則として直ちに測定してください(0～4℃で4時間保存可能)。

❖ 長期に保存する場合は-80℃以下に保存し凍結融解の繰り返しは避けてください。

①②

25g秤量した検体（食品）をフィルター付きストマッカー用バッグに入れ、プレストン培地100mLを加える。

②

ストマッカーで検体と増菌培地を均一化する。

③

ストマッカー処理をした試料を微好気条件下で42℃、24時間増菌培養する。

④

⑤

⑥

⑦

⑨

⑩

図9. 検査の流れ LAMP法と培養法との比較

III. 試薬の調製　IV. 試薬分注・サンプル溶液の添加

❑ 試薬の調製

- ❖ 操作は氷上でおこなってください。
- ❖ マスターミックスは検査毎に調製し、作り置きはしないでください。
- ❖ 調製後のキット試薬は、速やかに凍結保存してください。

【操作は領域Aで行います。】

① −20℃で保存していた酵素以外のキット試薬を室温で解凍し、使用するまで氷上で保存します。酵素は、そのまま氷上で保存します。

② 使用前に酵素以外の試薬をタッピングにて混合しスピンダウンを行います。酵素は、そのままスピンダウンします。

③ 別途用意した1.5mL滅菌チューブに、各試薬を分注します。

- ▩ 各試薬1テストあたり2×Reaction Mix. (RM) 12.5μL、Primer Mix.Cam (PM Cam) 2.5μL、Distilled Water (DW) 4μL、*Bst* DNA Polymerase 1μLを、陽性・陰性コントロールを含めた必要なテスト数分分注します。
- ❖ 実際のサンプル数＋α分のマスターミックスを調製することにより、滞りなく分注することができます(例：20サンプル実施の場合、21サンプル分のマスターミックスを調製)。

④ 転倒混和あるいはボルテックスミキサー(1秒間×3回)により十分混合した後、スピンダウンし、マスターミックスとします。なお調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

マスターミックスの調製分量

テスト数	1test	____test
2×Reaction Mix.	12.5μL	12.5μL× ____ =______μl
Primer Mix. Cam	2.5μL	2.5μL× ____ =______μl
Distilled Water	4μL	4μL× ____ =______μl
Bst DNA Polymerase	1μL	1μL × ____ = ______μl
Total	20μL	20μL × ____ = ______μl

❑ 試薬分注・サンプル溶液の添加(図10)

- ❖ 操作は氷上でおこなってください。
- ❖ 反応前にチューブにヒビ・キズ等がないことを予め確認してください。

【操作は領域Aで行います。】

① キット添付のPositive Control Cam (PC Cam)と、陰性コントロールとしてDistilled Water (DW)を予め準備しておきます。

- ❖ <u>Distilled Water (DW)の一部を予め分注しておき、陰性コントロールとして領域Cにて使用、保存します。</u>

② 試薬調製用のクリーンベンチ内でLoopamp®反応チューブにそれぞれマスターミックスを20μLずつ分注し、すべてのキャップを閉じます。

【操作は領域Cで行います。】

③ マスターミックス20μLが分注されている反応チューブにサンプルを5μLずつ添加し、ピペッティングで十分に混和します。

- ▩ ピペットの汚染を防ぐため、吸引操作はゆっくりおこなってください。

④ キャップを閉め、スピンダウンします。

⑤ スピンダウン終了後にはチューブ内に気泡がないことを確認してください。

- ▩ ピペットの汚染を防ぐため、吸引操作はゆっくりおこなってください。

図10. 試薬分注およびサンプル溶液の添加

V. LAMP反応および検出

❑LAMP反応および検出【領域D】

◆LAMP反応および検出はリアルタイム濁度測定装置にておこないます。LAMP反応条件は65℃60分間、その後反応停止条件として80℃、2分間とします。

① 使用する20分前までに電源を入れ装置を立ち上げてください。
② 反応前にチューブにヒビ・キズ等がないことを確認してください。
③ チューブを検出部に入れる際は、チューブ内に気泡がないことを確認してください（気泡があると、誤った判定の原因となります）。

◆LA-320C（図11）

① 本体がパソコンに接続されていることを確認し電源を投入してください。
② パソコンを起動し「LA-320C制御ソフト」を起動してください。
③ 測定条件を設定します（各試薬のパラメーター表を参照してください。パラメーター表は弊社担当者に御要請ください。）。
④ 予備加熱終了後、サンプルを測定部にセットし、ホットボンネットを閉めてください。
　◇ 反応チューブの確認（ヒビ・キズ、気泡等）を確実におこなってください。
⑤ [測定開始]を確実にクリックし測定を開始します。
　◇ [測定開始]をクリックしないとデータが保存されず、判定ができなくなってしまいます。
⑥ 32チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線、判定補助画面を表示します。
❖ 詳しくは、添付の取扱説明書をご覧ください。

◆RT-160C（図12）

① 本体の電源を投入してください。
② 測定条件を設定します（各試薬のパラメーター表を参照してください。パラメーター表は弊社担当者に御要請ください。）。
③ 予備加熱終了後 、サンプルを測定部にセットし、ホットボンネットを閉めてください。
　◇ 反応チューブの確認（ヒビ・キズ、気泡等）を確実におこなってください。
④ [Start/Heat]ボタンを押し、測定を開始します。
⑤ 16チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線、判定補助画面を表示します。
❖ 詳しくは、添付の取扱説明書をご覧ください。

❖反応後のチューブを検出部から取り出す際はチューブを破損しないように慎重に取り扱ってください。また反応チューブのキャップは、決して開けないでください。増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因になるだけではなく、試験環境を汚染し、汚染を除去しない限り、以後の試験で正しい結果が得られなくなる可能性があります。

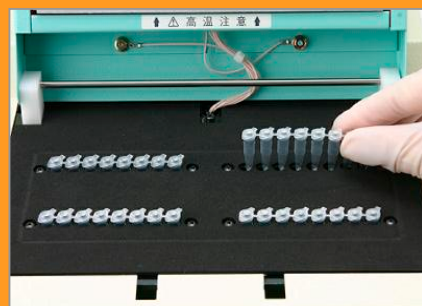



図11. LA－320C本体（上）とサンプル測定部（下）

図12. RT－160C本体（上）とサンプル測定部（下）

VI. 結果判定

❏結果判定【領域D】

◆ 判定の前に(図13)

判定の際には以下の点を確認した上で実施してください。

- 陽性コントロール、陰性コントロールの反応が適切に進行している。
  - ◇ 正常な反応が行われている場合、陽性コントロール、陰性コントロールおよび検体の増幅曲線は図13のようなパターンを示します。
  - ◇ 陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していなければ、LAMP反応は正常に進行しています。
- 増幅モードの増幅曲線による濁度上昇の有無。

図13. コントロールの増幅曲線パターン(左)
検体の増幅曲線パターン(右)

◆ LA-320C(図14)

① 増幅モード

- 反応の増幅曲線を示します(縦軸:Abs、横軸:時間)

② 判定モード

- 測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示します(縦軸:微分値、横軸:時間)。

③ 結果モード

- 測定結果を棒グラフで表示し、判定カードの色で判定結果の確認ができます。
- 陽性－赤、陰性－緑、測定中－黄 (青－増幅分)

図 14. 機器判定画面
(LA-320C)

◆ RT-160C(図15)

① 増幅モード

- 反応の増幅曲線を示します(縦軸:Abs、横軸:時間)。

② 微分グラフ表示

- 測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示します(縦軸:微分値、横軸:時間)。

③ 数値表示

- 測定結果を吸光度、立上り時間、判定で表示します。

図 15. 機器判定画面
(RT-160C)

◆ 注意事項

- 上記装置による判定は陽性／陰性を確定するものではありません。あくまでも判定を補助するための機能です。
- 最終的な結果判定は、陰性／陽性コントロールを比較対象とし増幅曲線で濁度の上昇を確認することによって行ってください。
- 詳細内容および上記以外の装置およびLAMP法試薬を用いての判定に関しては、各機器・試薬の取扱説明書・添付文書をご確認ください。

VII. 検査 フローチャート

試薬調製・分注　領域A

滅菌マイクロチューブ

┌ マスターミックス調製

テスト数	1test	______test
2×Reaction Mix.(RM)	12.5 μL	______μL
Primer Mix. Cam (PM Cam)	2.5 μL	______μL
Distilled Water (DW)	4 μL	______μL
Bst DNA Polymerase (Bst DNA Polymerase)	1 μL	______μL

↓ 分注 20μL/tube

┌ Loopamp 反応チューブ

サンプル溶液添加　領域C

→ ＋ 5μL/tube サンプル溶液・コントロール

← そのままピペッティングにて混和
- ・5μL/tube サンプル溶液 【測定検体】
- ・5μL/tube Positive Control Cam (PC Cam) 【陽性コントロール】
- ・5μL/tube Distilled Water (DW)

← スピンダウン 気泡がないか確認

LAMP反応液 25μL

LAMP反応・検出　領域D

Loopamp 濁度測定装置
- ← 電源投入
- ← 表示温度確認 65℃
- ← チューブをセット
- ← 反応開始ボタン投入
  - LAMP反応 （65℃ 60min）
  - 反応中、リアルタイム濁度測定・判定
  - 反応停止 （80℃ 2min）

データ処理

Ⅷ. アッセイシート

DATE		KIT NAME		Lot. No.	
ASSAY Profile				SHEET No.	

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8

Position	Profile
A1	
A2	
A3	
A4	
A5	
A6	
A7	
A8	
B1	
B2	
B3	
B4	
B5	
B6	
B7	
B8	
C1	
C2	
C3	
C4	
C5	
C6	
C7	
C8	
D1	
D2	
D3	
D4	
D5	
D6	
D7	
D8	

資料

CONTENTS

I.　クリーンベンチと安全キャビネットについて

❑クリーンベンチ（図 16）

- 外界と遮断された空間をつくる装置で、この中で実験を行えば、大気からの汚染を防ぐことができます。実験を行う前に紫外線で装置内の雑菌を殺し、実験中は細かい目のフィルタを通した清澄な空気を装置内に送り込むことによって装置内を陽圧に保ち、装置外→装置内に雑菌が入らないようにします。
- タイプとして、作業域のエアーを直接排出するタイプと、エアーカーテンを作り作業域のエアーを直接排出しないタイプ（一般的にバイオクリーンベンチと呼ばれる）があります。試薬調製は、コンタミネーションを防止する為に、必ずクリーンベンチか安全キャビネット内で操作を行ってください。
- なお、PCやサンプルの取扱は、絶対に排出型クリーンベンチでは行わず、作業域のエアーを直接排出しないバイオクリーンベンチか生物学的安全キャビネットを使用してください。

図 16. クリーンベンチ

❑生物学的安全キャビネット（図 17）

- クリーンベンチとは逆に装置外にウイルス等が漏出しないよう、装置内を陰圧に保ちます。
- 装置内の空気は、フィルターを通した後一部は排気され、残りの空気は再びフィルターを通して循環されます。更に実験者が手を入れて材料等を取り扱う面はエアーカーテンを作ることにより、内側の汚れている又はそのおそれのある空気と実験者を遮断します。これにより、実験者の安全性を高め、かつ実験材料と接した空気を濾過した後排出することができます。
- *C.jejuni* および *C.coli* は、バイオセーフティレベル（生物学的危険度）2に分類されますので、クラスIIA以上の安全キャビネット内で扱うことになっています。

図 17. 生物学的安全キャビネット

II.　遺伝子増幅検査を行う上での注意事項（詳細版）

❑はじめに

❖ LAMP反応は遺伝子を対象とし、大量のDNA産物を生成する遺伝子増幅検査です。検体、遺伝子の取り扱いを誤ると検査結果に大きく影響します。検査実施の際には以下の注意点をよくご理解いただき検査を実施してください。

□ 遺伝子増幅検査をおこなう上では、主に

「バイオハザード」
（検体処理時）
「DNase、RNaseのコンタミネーション」
「遺伝子のコンタミネーション」
（遺伝子抽出操作、試薬調製、反応液と抽出遺伝子の混合操作時）

の3点に対する注意が重要になります。

□「バイオハザード」

◆ バイオセーフティに基づいた注意事項を遵守します。
- 原則、施設にバイオセーフティ関連規則があればそれを遵守します。
  - 生物学用安全キャビネット内もしくは検査処理専用の領域で操作を行います。
  - ドラフト内、作業台の使用前後には次亜塩素酸ナトリウム水溶液での洗浄やUV照射を施します。
  - 使用する器具は領域専用とします。
  - 領域外に持ち出す際にはバイオハザード対策を施した後とします。
  - マスク、手袋および保護メガネを着用します。
  - 作業前後には手洗いを実施します。
  - 作業中の飲食・喫煙は厳禁とします。

□「DNase、RNaseのコンタミネーション」

- 検査に使用するチューブ等は滅菌されたものを使用し、使用後は廃棄します。
- 手袋、マスクを着用します。
- 検査中の私語、検査室内での飲食・喫煙は控えます。
- RNAを取り扱う場合には上記注意事項に加えて、以下の点にも注意します。
- 検査に使用する水は、DEPC処理水などRNaseフリーの水を用います。
- RNA検査実施検査台や検査器具を他と区別します。

□「遺伝子のコンタミネーション」

◆ 遺伝子のコンタミネーションを防ぐために以下の処置を実施します。
- 遺伝子混入を防ぐ環境を整える
  - 作業領域---作業領域分けをする。
  - 使用機材・試薬等---各領域専用とし、他領域への持ち込みは行わない。
  - 作業者---使い捨ての手袋、きれいな白衣を使用。極力遺伝子高濃度領域から低濃度領域への移動は避けます。
  - 器具---使用前後は、次亜塩素酸ナトリウム水溶液、DNA・RNA除去剤や紫外線（UV）を用いて遺伝子を除去します。
  - ❖ 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用の際には、換気を十分にしてください。
- 操作中におけるクロスコンタミネーションを防ぐ
  - 疎水性フィルター付きチップを使用し、使用後は廃棄します。
  - チューブ蓋の開閉時などではチューブ内壁、蓋裏面には触れないように注意します。
  - サイズの合った使い捨ての手袋を使用します。
  - 遺伝子の入ったチューブへの分注などは極力避けます。
- 増幅産物からの遺伝子コンタミネーションを防ぐ
  - 増幅反応後のチューブの蓋は開封しないでください。
  - 増幅産物の電気泳動はおこなわないでください。
  - やむを得ず、開封して増幅産物を取り扱う際には、コンタミネーションに十分配慮し行ってください。
  - 増幅産物の廃棄には、次亜塩素酸ナトリウム水溶液等を用いて遺伝子の除去処理を行うなど、施設の基準に則り廃棄してください。
  - 増幅産物が入っているチューブは決してオートクレーブをかけないでください。
  - ❖ 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用の際には、換気を十分にしてください。

II.　遺伝子増幅検査を行う上での注意事項（詳細版）

❑ バイオセーフティに基づいた注意事項

遺伝子増幅検査の結果への影響より、検査担当者の安全を目的とした対策となります。

検査対象物は病原微生物の感染の可能性があるため、検査実施の際にはそれを念頭において操作を行う必要があります。

バイオハザードを考慮すべき操作は、検査対象物そのものの搬入から抽出操作、すなわち微生物の不活化処理の間となります。設備等諸条件は各施設の該当規則に則して実施してください。

また、「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」にバイオセーフティに関する規定があります。対象の微生物に応じ必要な設備を整えたうえで検査を実施してください。

以下に主な注意事項を記します。

1. 検査対象物の取り扱い

- 生物学用安全キャビネット内もしくは検査処理専用の領域で操作を行います。
- ドラフト内、作業台の使用前後には次亜塩素酸ナトリウム水溶液で拭きます。併せて、可能であれば使用前後にはUV照射を施します。
- 施設にバイオセーフティ関連規則があればそれを遵守します。

2. 器具

- 使用する器具は領域専用とします。
- チップ・チューブは滅菌処理済のものを使用します。
- 領域外に持ち出す際には滅菌処理を施した後とします。
- 施設にバイオセーフティ関連規則があればそれに遵守します。

3. 検査担当者

- マスク、手袋および保護メガネを着用します。
- 作業前後には手洗いを実施します。
- 作業中の飲食・喫煙は厳禁とします。
- 施設にバイオセーフティ関連規則があればそれに遵守します。

❑ DNase、RNaseのコンタミネーションを防ぐために

DNase、RNaseは汗、唾液、涙など生体の細胞や分泌液に含まれており、サンプル内に混入すると、本来存在している遺伝子が分解され、遺伝子増幅反応がなされず、結果として擬陰性を引き起こすことになります。

DNase・RNaseの混入を防ぐため、以下の点に基づいた対策をとります。

- 検査に使用するチューブ等は使い捨てのものを使用します。
- 検査従事者は、必ず手袋、マスクを着用し、検査従事者自身の唾液や汗からの混入を防ぎます。
- 検査中の私語、検査室内での飲食・喫煙は控えます。

RNAを取り扱い場合には上記注意事項に加えて、以下の点にも注意します。

- 検査に使用する水は、DEPC処理水などDNase、RNaseフリーの水を用います。
- RNA検査実施検査台や検査器具を他と区別します。

◆ 各器具のDNase・RNaseフリー化

① チューブ

◇ 市販の滅菌済み未使用チューブを使用します。使用後は廃棄します。

② チップ

◇ 市販の滅菌済疎水性フィルター付きチップを使用します。使用後は廃棄します。

③ その他器具

◇ 極力素手で触らず手袋を着用した上で使用・操作します。使用後は廃棄します。

◆ 検査担当者からのDNase・RNaseコンタミネーション防止の徹底

① マスク・手袋の着用

◇ マスクは使い捨てのものを使用します。
　領域外への移動は極力避けるようにします。

◇ 使い捨て手袋（ラテックス手袋など）を着用します。
　各領域内に限り使用とします。他領域への持込は厳禁とします。
　領域外へ移動せざるを得ない場合には領域A→B→C→D（遺伝子低濃度領域から高濃度領域）の移動のみとし　領域D→C→B→Aへの移動は厳禁とします。

② 検査室での私語・飲食・喫煙の厳禁

◇ 検査室内、特に検査中の不必要な私語は避けます。
　私語による唾液の飛散に伴うDNase・RNaseコンタミネーションの防止が目的。

◇ 検査室内での飲食・喫煙は厳禁とします。
　飲食・喫煙による唾液の飛散に伴うDNase・RNaseコンタミネーションの防止が目的。
　検査中は当然のことながら、検査中でなくとも検査室での飲食・喫煙は厳禁とします。

II. 遺伝子増幅検査を行う上での注意事項（詳細版）

❑遺伝子のコンタミネーションを防ぐために

◆ LAMP反応は非常に鋭敏な反応であり、DNAがごく微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となります。コンタミネーションを回避するために、以下の注意点を踏まえて検査をおこなってください。

1. 遺伝子混入を防ぐ環境を整える

操作中における遺伝子の混入を極力防ぐための環境を整えます。

①作業領域（図 18、19）

各作業における遺伝子のコンタミを防止するために作業ごとに操作する領域を区分けします。遺伝子の濃度及び生物学的危険度（バイオハザードレベル）により作業領域を区分けします。

領域A
試薬調製
【遺伝子濃度→無、バイオハザードレベル→低】
遺伝子、バイオハザード共に汚染度が最も低い領域。
◆クリーンベンチ
◆試薬調製専用の検査室
◆試薬調製専用の作業台

領域B
検体取り扱い及び抽出操作
【遺伝子濃度→低、バイオハザードレベル→高】
遺伝子汚染度は低いが、バイオハザード汚染度が最も高く、遺伝子コンタミネーション防止より、検体からの感染を防止するための領域。
◆生物学用安全キャビネット
◆検体取り扱い専用の検査室
◆検体取り扱い専用の作業台

領域C
増幅試薬と抽出遺伝子混合操作
【遺伝子濃度→中、バイオハザードレベル→低】
遺伝子汚染度は領域Bと大きく変わらないが、生物学的汚染度が領域Bより低い領域。

領域D
遺伝子増幅（増幅機器設置場所）
【遺伝子濃度→高、バイオハザードレベル→低】
遺伝子汚染度が最も高く、他作業への遺伝子コンタミネーション防止のための領域。
◆遺伝子増幅機器を設置する検査室

図 18. LAMP法操作における領域分けのイメージ

②使用器具・試薬等

原則各領域専用とし、物品の領域外への移動はチューブ、ラックなど、必要最小限にします。

A) ピペット(図 20)

各領域専用のものとします。

- 試薬調製用（領域A）
- 検体取り扱い用（領域B）
- 抽出操作用（領域B）
- 抽出遺伝子操作用（領域C）
- 陽性コントロール操作用（領域C）
- （増幅産物操作用（領域D））

B) チューブラック

ピペット同様、基本的に各領域専用とします。

- 検査作業効率上やむを得ず領域外へ移動せざるを得ない場合には領域A→B→C→Dの移動のみ（すなわち遺伝子低濃度領域から高濃度領域への移動のみ）とし、領域D→C→B→Aへの移動は厳禁とします。
- 移動したラックを元の領域へ戻す場合は、「遺伝子フリー」化処理後に戻します。

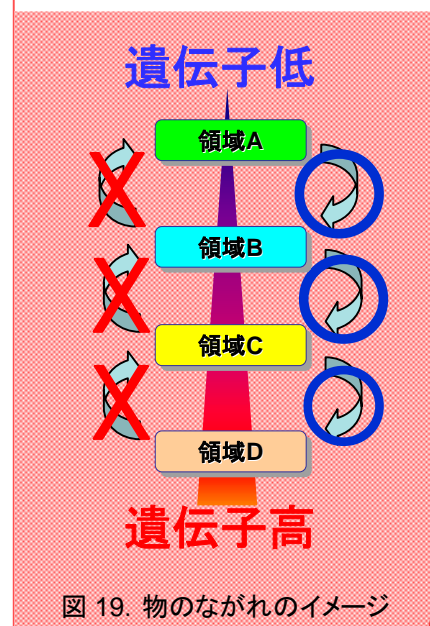



図 19. 物のながれのイメージ

II.　遺伝子増幅検査を行う上での注意事項（詳細版）

C)　チューブ

DNA・RNA・DNase・RNaseフリーのものを使用します。

- 市販UV滅菌済チューブ
- オートクレーブ処理済チューブ
- 領域Aに保管・使用し、必要に応じ領域外に移動する。
- 領域外へ移動せざるを得ない場合には領域A→B→C→Dの移動のみ（すなわち遺伝子低濃度領域から高濃度領域への移動のみ）とし、領域D→C→B→Aへの移動は厳禁とします。

D)　チップ

使い捨てで使用します。
疎水性フィルター付チップを使用します。

- 領域Aにて保管し、各領域にて開封し使用します。
- 開封後は他領域持ち込みは厳禁とします。
- 領域外へ移動せざるを得ない場合には領域A→B→C→Dの移動のみ（すなわち遺伝子低濃度領域から高濃度領域への移動のみ）とし、領域D→C→B→Aへの移動は厳禁とします。
- 使用済みチップは専用のチップ捨てを予め用意し、使用後は密閉した後に移動、処理を行ってください。

E)　筆記用具

各領域専用のものとします。

- サインペン、鉛筆、消しゴムなど----領域専用のものを使用し、他領域（事務領域も含む）からの持込は厳禁とします。
- 検査レジュメなど---- 持込書類を置く専用の場所を設け、そこに置くようにします。または、各領域専用バインダーなどを用意し、閲覧するようにします。

F)　試薬(表 2)

各領域専用とします。

- 使用領域ごとに分けて保存・使用します。

図 20. ピペット領域分けの例

表 2. 試薬の保存および使用領域例

例）各種増幅試薬キット	
Extraction Solution	領域Aにて分注後 領域Bにて保存、使用
Extraction Solution(NC)	領域Cにて保存、使用
1M Tris-HCl	領域Bにて保存、使用
Reaction Mix.	領域Aにて保存、使用
2×Reaction Mix.	領域Aにて保存、使用
Bst DNA Polymerase	領域Aにて保存、使用
Enzyme Mix.	領域Aにて保存、使用
Positive Control	領域Cにて保存、使用

例）DNA・RNA増幅試薬キット、各種プライマーセット	
2×Reaction Mix.	領域Aにて保存、使用
Bst DNA Polymerase	領域Aにて保存、使用
Enzyme Mix.	領域Aにて保存、使用
Distilled Water	領域Aにて保存、使用
Primer Mix. DNA	領域Aにて保存、使用
Positive Control	領域Cにて保存、使用
プライマー	領域Aにて保存、使用

③　作業者

A)　着用衣類

使い捨て手袋（ラテックス手袋など）を着用

- 各領域内に限り使用し、他領域への持込は厳禁とします。
- 領域外へ移動せざるを得ない場合には領域A→B→C→Dの移動のみ（すなわち遺伝子低濃度領域から高濃度領域への移動のみ）とし、領域D→C→B→Aへの移動は厳禁とします。

きれいな白衣を使用する

- 各領域に白衣を調えることが望ましい。
- 領域外へ移動せざるを得ない場合には領域A→B→C→Dの移動（すなわち遺伝子低濃度領域から高濃度領域への移動のみ）とし、極力領域D→C→B→Aへの移動は行わないこととします。

B)　作業者の移動

- 極力遺伝子高濃度領域から低濃度領域への移動は避けます。

④　遺伝子除去操作

使用前後には、次亜塩素酸ナトリウム水溶液、DNA・RNA除去剤や紫外線（UV）を用いて遺伝子を除去します。

A)　次亜塩素酸ナトリウム水溶液、DNA、RNA除去剤による遺伝子除去

0.275%(v/v)（2,750ppm）次亜塩素酸ナトリウム水溶液で5μgのプラスミドDNAと5μgのyeast tRNA混合物を10分間室温反応後の、アガロースゲル電気泳動像ではバンドが確認されません[12]。また、0.55%(v/v)（5,500ppm）次亜塩素酸ナトリウム水溶液で30秒以上処理したDNAはPCR増幅がなされません[12]。

次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意を必要とします。また、劣化も激しく、高温環境下での保存では劣化が著しくなるため、保存環境や調製後の経過日数にも注意が必要になります。また、金属に対する腐食性もあるため、金属に対する使用に関しては、早めにかつ十分に塩素成分をふき取るなどの対応が必要となります。次亜塩素酸ナトリウム水溶液と同様に市販のDNA、RNA除去剤も有効です。

II.　遺伝子増幅検査を行う上での注意事項（詳細版）

- 予め、有効塩素濃度5,500 ppm（0.55%）程度の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用意します。
- 作業前後には作業台、ピペットを次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたキムタオル等でふき取ります。
- サンプル、増幅産物溶液をこぼした場合には次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたキムタオル等で速やかにふき取ります。
- 作業終了後にはラック（プラスチック製など非金属製のもの）等を次亜塩素酸ナトリウム水溶液に1晩浸し、よくすすいだ後乾燥し、再利用します。
- 検査室、作業台、器具等は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて洗浄します。
- ❖ 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用の際には、換気を十分にしてください。

B）　紫外線照射による遺伝子除去

紫外線は光の一種で波長は100～400nmであり、さらに作用によりUV-A（波長315～400nm）、UV-B（波長280-315nm）、UV-C(波長100-280nm)に分けられます。このうち殺菌作用があるUVはUV-Cであり、特に240～280nmの波長はDNAによく吸収され、DNA鎖を破壊する作用を持ちます。

- クリーンベンチ等のUVランプで遺伝子除去することができます。
- プラスチックなどに腐食性が高く、過度のUV照射はプラスチック材質の脆壊を引き起こすので十分に注意します。
- UVは影の部分には効果がないので、照射の際には注意します。
- 作業終了後にはラック（金属製など非プラスチック製のもの）にUVを1晩照射し、遺伝子除去操作後に再利用します。
- 使用後の検査室のUV管点灯による照射も効果的です。
- ❖ 紫外線は有害で、点灯中のUVランプを短時間見つめただけでも、あとで目が痛くなり、結膜炎に似た症状を起こしますので、UVを直視することは避けてください。

2.　操作中におけるクロスコンタミネーションを防ぐ

ここでのクロスコンタミネーションは器具—器具間などで遺伝子が移り混ざってしまう現象を言います。これにより本来陰性であった検体が陽性化してしまうことになります。これを防ぐために主に操作中に注意をします。

- チップは疎水性フィルター付きを使用し、使い捨てとします。
- チューブ蓋の開閉時などではチューブ内壁、蓋裏面には触れないように注意します。
- サイズの合った手袋を使用します。
- 遺伝子の入ったチューブへの分注などは極力避け、実施の際にはチップ先などがチューブに触れないように注意します。

3.　増幅産物からの遺伝子コンタミネーションを防ぐ

LAMP法にて増幅された遺伝子増幅産物は非常に多く、適切に取り扱わない場合には、遺伝子のコンタミネーションを引き起こします。増幅産物の取り扱いに関して、以下の点にご注意ください。

- 増幅反応後のチューブの蓋は開封しないでください。
- 増幅産物の電気泳動はおこなわないでください。
- やむを得ず、開封して増幅産物を取り扱う際には、コンタミネーションに十分配慮し行ってください。
- 増幅産物の廃棄には、次亜塩素酸ナトリウム水溶液等を用いて遺伝子の除去処理を行うなど、施設の基準に則り廃棄してください。
- 増幅産物が入っているチューブは決してオートクレーブをかけないでください。水蒸気を介し、エアロゾル化したLAMP産物によりコンタミネーションを引き起こします。
- 増幅産物の取り扱いは領域Dのみとし、他領域への持ち込みは決しておこなわないでください。
- ❖ 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用の際には、換気を十分にしてください。

4. コンタミネーションが発生した場合

万が一コンタミネーションが発生した場合、遺伝子を除染する必要があります。遺伝子の除染には0.55%次亜塩素酸ナトリウム水溶液（又はDNA除去剤）もしくは紫外線ランプを用います。

以下に対処法の一例をご紹介します。

- ディスポーザブルのピペットチップ、試薬調製用チューブ等は廃棄します。
- 作業台、クリーンベンチ、安全キャビネット内を次亜塩素酸ナトリウム水溶液や、市販のDNA、RNA除去剤で拭きます。
- ピペット、チューブスタンド等の器具は、次亜塩素酸ナトリウム水溶液や、市販のDNA、RNA除去剤で拭きます。プラスチック製など次亜塩素酸ナトリウムによる腐食の影響がない材質性の器具に関しては次亜塩素酸ナトリウム水溶液に一晩浸します。
- 次亜塩素酸ナトリウム水溶液や、市販のDNA、RNA除去剤で洗浄済み器具類をクリーンベンチ、安全キャビネット内に置き、UV照射して一晩放置します。
- 後日陰性コントロールを測定し、除染の確認をおこないます。
- その他、施設の安全規程に従い対処します。
- ❖ 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用の際には、換気を十分にしてください。

❏DNase、RNaseのコンタミネーションを防ぐために

DNase、RNaseは汗、唾液、涙など生体の細胞や分泌液に含まれており、サンプル内に混入すると、本来存在している遺伝子が分解され、遺伝子増幅反応がなされず、結果として擬陰性を引き起こすことになります。

DNase・RNaseの混入を防ぐため、以下の点に基づいた対策をとります。

- 検査に使用するチューブ等は使い捨てのものを使用します。
- 検査従事者は、必ず手袋、マスクを着用し、検査従事者自身の唾液や汗からの混入を防ぎます。
- 検査中の私語、検査室内での飲食・喫煙は控えます。

RNAを取り扱い場合には上記注意事項に加えて、以下の点にも注意します。

- 検査に使用する水は、DEPC処理水などRNaseフリーの水を用います。
- RNA検査実施検査台や検査器具を他と区別します。

1. 各器具のDNase・RNaseフリー化

① チューブ

- 市販の滅菌済み未使用チューブを使用します。使用後は廃棄します。

② チップ

- 市販の滅菌済疎水性フィルター付きチップを使用します。使用後は廃棄します。

③ その他器具

- 極力素手で触らず手袋を着用した上で使用・操作します。使用後は廃棄します。

2. 検査担当者からのDNase・RNaseコンタミネーション防止の徹底

① マスク・手袋を着用する。

- マスクは使い捨てのものを使用します。
  領域外への移動は極力避けるようにします。
- 使い捨て手袋（ラテックス手袋など）を着用します。
  各領域内に限り使用とします。他領域への持込は厳禁とします。
  領域外へ移動せざるを得ない場合には領域A→B→C→D（遺伝子低濃度領域から高濃度領域）の移動のみとし、領域D→C→B→Aへの移動は厳禁とします。

② 検査室での私語・飲食・喫煙の厳禁

- 検査室内、特に検査中の不必要な私語は避けます。
  私語による唾液の飛散に伴うDNase・RNaseコンタミネーションの防止が目的。
- 検査室内での飲食・喫煙は厳禁とします。
  飲食・喫煙による唾液の飛散に伴うDNase・RNaseコンタミネーションの防止が目的。
  検査中は当然のことながら、検査中でなくとも検査室での飲食・喫煙は厳禁とします。

III.　引用文献

1)　Notomi T. et al.: Nucleic Acids Research 28, No.12, e63 (2000)
2)　Nagamine K. et al.: Clin. Chem. 47, No 9, 1742－1743 (2001)
3)　森 安義, 他 : 第23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2000)
4)　Mori Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No.1, 150－154 (2001)
5)　富田 憲弘, 他 : 第26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2003)
6)　Kohker S. et al. : Infect Immun. 58, No.6 : 1943－50 (1990)
7)　Wuenscher MD. et al. : J Bacteriol. 175, No.11, 3491－3501 (1993)
8)　Yoshino M. et al. : American Society for Microbiology The 104th General Meeting (2004)
9)　吉野 学, 他 : 第25 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 p22 (2004)
10)　日本細菌学会バイオセイフティー委員会：日本細菌学雑誌, 54, No 3, 667－715 (1999)
11)　Aslanzadeh J.: Annals of Clinical Laboratory Science. 34, No 4, 389－396 (2004)
12)　Prince AM. Et al. :Biotechniques. 12, No 3, 358－360 (1992)
13)　保科定頼. : 臨床病理レビュー特集 112号「医療廃棄物の適正処理マニュアル－感染性廃棄物を中心に－」.98－103 (2000)

AMK01	8052

2006年4月作成